



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Detección de parvovirus canino tipo 2 (CPV 2) en
perros de Lima Metropolitana mediante PCR**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Raquel QUINO QUISPE

ASESOR

Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Quino R. Detección de parvovirus canino tipo 2 (CPV 2) en perros de Lima Metropolitana mediante PCR [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2017.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO**

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **jueves 21 de setiembre del 2017**, a las **10:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0203-EPMV/FMV-2017, integrado por los siguientes profesores:

Hermelinda Rivera Gerónimo
Lenin Maturrano Hernández
Mercy Ramírez Velásquez
Viviana Fernández Paredes

Presidente del Jurado
Asesor de la Tesis
Miembro del Jurado
Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **QUINO QUISPE, Raquel**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“DETECCIÓN DE PARVOVIRUS CANINO TIPO 2 (CPV 2) EN PERROS DE LIMA METROPOLITANA MEDIANTE PCR”

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **QUINCE (15)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **11:30 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Hermelinda Rivera Gerónimo, MV Mg. Prof. Principal D.E.

Lenin Maturrano Hernández, Blgo. Dr. Prof. Asociado D.E.

Mercy Ramírez Velásquez, MV Mg. Prof. Auxiliar D.E.

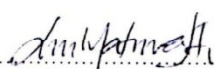
Viviana Fernández Paredes, MV. Prof. Asociada T.C.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0203-EPMV/FMV-2017

PRESIDENTE : 
HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO

MIEMBROS : 
LENIN MATURRANO HERNÁNDEZ
Asesor de la Tesis

: 
MERCY RAMIREZ VELÁSQUEZ

: 
VIVIANA FERNÁNDEZ PAREDES

San Borja, 21 de setiembre de 2017

Vº Bº

.....
Dr. Raúl Rosadio Alcántara
Decano

AGRADECIMIENTOS

Hay muchas personas quienes colaboraron de una u otra forma en la realización de esta tesis, los Dres. Efraín Gonzalez, Tito Gonzalez y Jhon Acuña que me permitieron tomar muestras en sus respectivas clínicas, a Danny, Percy, Cristian y demás amigos y amigas que me ayudaron a la colección de las mismas.

Agradezco también a todo el equipo del Laboratorio de Biología y Genética Molecular, principalmente a Rocío quien me capacitó para el procesamiento de las técnicas y a Luis quien siempre me orientó y aconsejó. Al Dr. Lenin Maturrano, al Dr. Raúl Rosadio que siempre me apoyaron, guiaron y me dieron la oportunidad de formar parte del laboratorio.

Como colaboración especial, agradezco al Dr. Rubén Pérez de la Universidad de la República de Uruguay por su constante colaboración en este proyecto aportando su conocimiento y experiencia, por sus trabajos e investigaciones en relación al tema.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ANEXOS	v
I.	INTRODUCCIÓN 1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA 3
2.1.	ETIOLOGÍA 3
2.2.	ESTRUCTURA DEL CPV 3
2.3.	HOSPEDEROS 4
2.4.	TRANSMISIÓN Y DISEMINACIÓN 5
2.5.	SUSCEPTIBILIDAD Y FACTORES DE RIESGO.....	5
2.6.	EPIDEMIOLOGÍA 6
2.7.	PATOGÉNESIS 8
2.8.	CUADRO CLÍNICO 9
2.9.	DIAGNÓSTICO 10
2.9.1.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) 11
2.10.	CONTROL Y PREVENCIÓN 13
III.	MATERIALES Y MÉTODOS 14
3.1.	LUGAR DE ESTUDIO 14
3.2.	TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS 14
3.2.1.	ANIMALES Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS 14

3.2.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL	15
3.2.3.	EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL	15
3.2.4.	IDENTIFICACIÓN POR PCR	16
3.2.5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	17
IV.	RESULTADOS	18
V.	DISCUSIÓN	20
VI.	CONCLUSIÓN	24
VII.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	25
VIII.	ANEXOS	30

RESUMEN

El virus del parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) es uno de los principales agentes asociados a enteritis hemorrágica aguda de alta morbilidad y variable mortalidad en caninos jóvenes. Por ello, el objetivo de este estudio fue detectar la presencia del virus en perros jóvenes mediante la técnica de PCR, usando cebadores que permitieron la amplificación de un fragmento del gen de la proteína VP2 y comparar este resultado con el diagnóstico clínico. Para tal propósito, fueron colectados hisopados rectales de 78 perros menores a un año de edad y sin historia de vacunaciones previas, de los cuales 39 individuos tuvieron un diagnóstico clínico de parvovirus canino y los otros 39 fueron animales clínicamente sanos. Para la extracción de ADN viral, se usó el método *fast boiling*, en donde las muestras fueron sometidos a un hervido a 100°C con posterior centrifugación para extraer el sobrenadante, el cual fue usado como molde para la reacción de PCR. Se usaron cebadores específicos que amplifican un fragmento de 1316 pares de bases del gen VP2 del virus CPV-2, utilizando como control positivo una vacuna comercial. El virus fue detectado en el 62% de animales con diagnóstico clínico de la enfermedad con PCR convencional, no siendo detectado en los perros del segundo grupo. El valor predictivo positivo del diagnóstico clínico indicó que solo el 61% de animales clínicamente enfermos serán positivos a CPV-2 por PCR convencional, por lo que se recomienda el uso de técnicas complementarias para un buen diagnóstico de la enfermedad.

Palabras clave: Parvovirus canino, Hisopados rectales, PCR

ABSTRACT

Canine parvovirus type 2 (CPV-2) virus is one of the main agents associated with acute hemorrhagic enteritis of high morbidity and variable mortality in young canines. Therefore, the objective of this study was to detect the presence of the virus in young dogs using the PCR technique, using primers that allowed the amplification of a fragment of the VP2 protein gene and to compare this result with the clinical diagnosis. For this purpose, rectal swabs were collected from 78 dogs less than one year old and with no history of previous vaccinations, of which 39 individuals had a clinical diagnosis of canine parvovirus infection and the other 39 were clinically healthy animals. For the extraction of viral DNA, the fast boiling method was used, where the samples were boiled at 100 ° C with subsequent centrifugation to extract the supernatant, which was used as a template for the PCR reaction. Specific primers were used to amplify a 1316 bp fragment of VP2 protein gene, using as a positive control a commercial vaccine. The virus was detected in 62% of animals with clinical diagnosis of the disease with conventional PCR, not being detected in the dogs of the second group. The positive predictive value of the clinical diagnosis indicated that only 61% of clinically ill animals will be positive for CPV-2 by conventional PCR, so the use of complementary techniques for a good diagnosis of the disease is recommended.

Key words: Canine Parvovirus, rectal swabs, PCR

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Cebadores utilizados en la amplificación del fragmento de 1316 pb del gen de VP2 de CPV-2, secuencia en sentido 5'-3' y la posición en el genoma en la que hibrida cada uno de ellos.	17
2	Resultado de la amplificación del gen de la proteína VP2 de CPV-2 y concordancia entre el diagnóstico molecular y diagnóstico clínico.	18

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Resultado de la amplificación del gen de la proteína VP2 de CPV-2 de los casos con sintomatología compatible con Parvovirus Canina	19

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Título	Página
1	Cuadro de datos generales de perros muestreados clínicamente enfermos.	30
2	Cuadro de datos generales de perros muestreados clínicamente sanos.	32

I.

II.

III.

IV.

I. INTRODUCCIÓN

El Virus del Parvovirus Canino (CPV) es un virus pequeño (18-22 nm) que no posee envoltura, su ADN es de cadena simple negativo y pertenece al género *Protoparvovirus*, subfamilia *Parvovirinae* de la familia *Parvoviridae*. Actualmente se sabe que existen 2 tipos de parvovirus canino, CPV-1 y CPV-2, teniendo en cuenta que de este último derivan otras 3 variantes identificadas hasta el momento: CPV-2a, CPV 2b y CPV-2c. La importancia de los virus que pertenecen al género *Protoparvovirus* radica en la alta mortalidad en animales como porcinos, felinos y caninos. El CPV-2 es uno de los principales agentes involucrados en la enteritis hemorrágica de cachorros, provocando una elevada tasa de mortalidad en estos animales (Maya *et al.*, 2012; Cotmore *et al.*, 2014).

La Parvovirosis canina es una enfermedad que surge en los años 70, siendo reconocida por primera vez en 1978. Es causada por el parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), es transmitida mediante vía fecal-oral o por fomites y afecta principalmente a los perros menores a un año de vida, presentándose clínicamente con vómitos, diarreas

hemorrágicas y produciendo en consecuencia de esto deshidratación, shock y muerte (Aldaz *et al.*, 2013).

El estudio de esta enfermedad y de las diferentes variantes antigénicas del virus CPV-2 se ha extendido en América del Sur y en el mundo, así como Estados Unidos, Vietnam, Italia, España, Uruguay, Chile, Argentina, Brasil, Cuba y Ecuador donde han determinado no solo la presencia de la enfermedad en su respectiva zona, sino también las variantes antigénica de estos (Aldaz *et al.*, 2013; Fontana *et al.*, 2013; Gallo *et al.*, 2015).

En Perú, no existe información respecto a la prevalencia de infección, frecuencia de presentación de animales con signos clínicos o del comportamiento del virus en nuestro medio, sin embargo se conoce la existencia la enfermedad en el país (Gamboa, 1980). El objetivo de este estudio es detectar la presencia del virus en los perros muestreados por la técnica de PCR.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ETIOLOGÍA

La familia *Parvoviridae* está formada por dos subfamilias: *Parvovirinae* y *Densovirinae*. De las cuales, la primera subfamilia tiene los géneros *Protoparvovirus*, *Erytrovirus* y *Dependovirus*. El género *Protoparvovirus* presenta cinco especies, dentro de los cuales se encuentra *Carnivore protoparvovirus 1*, el cual incluye al CPV-1, CPV-2 y FVP, y el *Ungulate parvovirus 1* donde se encuentra el parvovirus del porcino (Parker *et al.*, 1997; Sosa, 2009; Hurtado, 2012; Cotmore *et al.*, 2014).

2.2. ESTRUCTURA DEL CPV

El Virus del Parvovirus Canino (CPV) es un virus pequeño, de 18-22 nm, no posee envoltura, y pertenece a la familia *Parvoviridae*. Posee una cadena de ADN simple, de polaridad negativa (ss ADN), teniendo un genoma de 5.2 kb de tamaño (Maya *et al.*, 2012). El genoma consta apenas de dos cuadros de lectura abierta (*ORFs*, *Open Reading frames*), siendo que el ORF relacionado a la región terminal 3' codifica para dos proteínas no estructurales: NS1 y NS2, los cuales son esenciales para la replicación de ADN. Las regiones terminales-N de las proteínas NS1 y NS2 son idénticas en secuencia, mientras que la región terminal-C de NS2 es derivado desde un corte y empalme diferenciado del ARNm y es trasladado desde un diferente marco de lectura que la NS1. El ORF relacionado a la región terminal 5' codifica para las proteínas 1 y 2 de

la cápside viral (VP1 y VP2). Estas proteínas tienen una secuencia idéntica, con excepción del aminoácido 143 de región terminal-N, el cual es único en la VP1 (Pérez *et al.*, 2014).

2.3. HOSPEDEROS

El virus del Parvovirus canino pertenece a la familia *Parvoviridae*, el cual está dividido en dos subfamilias basadas en su rango de hospederos: *Parvovirinae*, que afecta a los vertebrados y *Densovirinae* que afecta a insectos y artrópodos. Siendo el CPV perteneciente a la primera subfamilia en mención.

Las proteínas de la cápside determinan el rango de hospederos de diversos virus del parvovirus, incluyendo caninos (CPV), felinos (FPV), visón (virus entérico del visón), ratón (virus diminuto del ratón) y porcinos (parvovirus porcino) (Parker *et al.*, 1997).

In vitro, el CPV tiene la capacidad de replicación en cultivos celulares de felinos y caninos, mientras que FPV, sólo puede replicarse en células felinas (Parker *et al.*, 1997).

El CPV-2 afecta principalmente a caninos domésticos, aunque hay hipótesis donde se postula que se originó de una mutación directa del virus de la Panleucopenia Felina. Asimismo, hay otras teorías que mencionan que se originó a partir de la

adaptación de hospedadores intermediarios como tejones y zorros (Díaz *et al.*, 2008).

2.4. TRANSMISIÓN Y DISEMINACIÓN

La Parvovirus es una enfermedad altamente contagiosa, siendo que el contagio ocurre principalmente mediante la vía fecal-oral/nasal, el cual se da por contacto de animales susceptibles con animales enfermos, entre los días 8-12 post infección (Sosa, 2009). La vía de contagio también puede darse por medio de fomites, siendo que las heces de animales infectados pueden cargar una gran cantidad de partículas virales, contaminando las superficies donde haya contacto directo, y al ser el virus altamente resistente, debido a no poseer envoltura, tiende a mantenerse por largos periodos de tiempo en el ambiente (Hurtado, 2012).

2.5. SUSCEPTIBILIDAD Y FACTORES DE RIESGO

Todas las razas de perros pueden adquirir la enfermedad, sin embargo, las razas con mayor riesgo a adquirirla son Rottweiler, Doberman, Labrador Retriever, Doberman Pischer, Pitbull y Pastor Alemán, aunque se desconoce la razón de esta sensibilidad (Hurtado, 2012). El estrés, la edad (menor a 12 meses), el parasitismo, la alta concentración de los animales en un mismo ambiente, el destete de los cachorros, una falla en la transferencia de anticuerpos vía calostro, ineficacia de la primera vacuna, un mal programa de vacunación o falta de vacunaciones son factores que predisponen al desarrollo de esta enfermedad (Dubina, 2013; Ling *et al.*, 2012).

Si bien el virus puede infectar en cualquier mes del año, son los meses más cálidos donde hay mayor frecuencia de la enfermedad (Ling *et al.*, 2012). De esta manera, durante el periodo de 1981-1990 se realizó un estudio para determinar la distribución temporal de la Parvovirus clínica en Chile y se encuentra que hubo un aumento de los casos en los meses de enero, febrero, marzo, mayo y octubre, meses más cálidos en América del Sur (Ernst *et al.*, 1992).

La alta resistencia del virus en el medio ambiente, frente a la temperatura ambiental y sobrevivencia en heces por más de un año, mientras que el virus por si solo puede perdurar en suelos por más de 5 meses, permitiendo una mayor probabilidad de que el virus pueda infectar animales susceptibles (Dubina, 2013).

Siendo que el virus es resistente a muchos desinfectantes de uso común (hipoclorito es uno de los pocos desinfectantes con capacidad de inactivar al virus), una inadecuada higiene del ambiente de los animales puede contribuir a la alta tasa de infección (Dubina, 2013).

2.6. EPIDEMIOLOGÍA

A partir de los años 70 surge el CPV-2 derivando del virus de la Panleucopenia Felina (FPV), unos cuantos años después aparecieron dos nuevas variantes antigénicas, CPV-2a y CPV-2b. Actualmente el CPV ha mutado a una nueva variante, CPV-2c, el cual ya está distribuido y existe conjuntamente con las otras variantes antigénicas, en

países de Europa, América del Sur y del Norte (Zhao *et al.*, 2013). Estas variantes se clasifican en base al aminoácido de la posición 426 de la proteína VP-2, siendo de tal modo: Asn (CPV-2a), Asp (CPV-2b) y Glu (CPV-2c) (Chiang *et al.*, 2016).

A los pocos meses de aparecer se propagó por todo el mundo, provocando la muerte de miles de perros (Sosa, 2009). Desde entonces se ha convertido en la causa más frecuente de enteritis vírica, de alta mortalidad (hasta 10%) y morbilidad (100%) en cachorros de entre seis y doce semanas de edad, causando graves cuadros diarreicos en los mismos (García, 2007; Hurtado, 2012; Nandi, 2009).

En condiciones naturales, la cepa original CPV-2 afecta únicamente a los perros, afectando a los perros de todas las razas, sexo y edad, aunque en su mayoría ataca a los cachorros de 6-20 semanas de vida, siendo los no vacunados los más predisponentes (Hurtado, 2012; Dubina, 2013).

La distribución de la Parvovirus Canina es a nivel mundial. En el año 2000, un virus CPV-2 mutante con una alteración en un sitio específico, fue reconocido por primera vez en Italia en el año 2000, como una nueva variante, la CPV-2c, después fue en Viena y España (2004 y 2006 respectivamente), actualmente esta variante ya se encuentra en muchos países del mundo. En América del Sur, los primeros casos de enteritis hemorrágica en caninos se observaron en el sur de Santiago en 1980, luego los reportes de las variantes de CPV-2 incluyen países como Uruguay, Brasil, Chile y Argentina (Pérez *et al.*, 2007; Puentes *et al.*, 2012; Dubina, 2013, Gallo *et al.*, 2015).

En Perú, a partir de 1980, se comenzó a notar signos característicos de la enfermedad, en cachorros entre 4 a 12 semanas de edad. Fue entonces, que en este año se determinó que dentro de 31 animales con signos clínicos compatibles a la enfermedad, 29 de ellos tuvieron reacción positiva a la prueba de IHA, siendo los animales muestreados procedentes de Lima, Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria (Gamboa, 1980).

2.7. PATOGÉNESIS

Una vez que el perro es infectado, existe un periodo de incubación de 3-7 días antes de la presentación de los primeros signos. Dentro del animal, el CPV necesita de la ayuda de las células de rápida división para causar la enfermedad satisfactoriamente, siendo las tonsilas los primeros órganos en ser atacados por el virus. Una vez dentro de las tonsilas, el virus generalmente invade los linfocitos por uno o dos días para replicarse. Estos virus se establecen dentro de los linfocitos, donde son protegidos de las células de defensa y pueden entrar al torrente sanguíneo. Muchos de esos linfocitos infectados por CPV son finalmente destruidos, causando una disminución en el número de linfocitos circulantes, causando una linfopenia (Aldaz *et al.*, 2013).

Una vez en el torrente sanguíneo, el virus nuevamente va hacia células de rápida división, atacando la médula ósea y las células de las paredes del intestino delgado, en las criptas de Lieberkühn, provocando diarreas y daño entérico. En perros muy jóvenes, CPV también puede infectar el corazón, provocando inflamación del músculo cardíaco,

pobre función y arritmias (Decaro, 2012).

Esto causa ambos tanto la pérdida de fluidos por la diarrea y la infección extendida dentro del cuerpo. Para agravar el problema, el sistema inmune y su habilidad para producir nuevas células blancas para combatir la infección del cuerpo están debilitadas, por la invasión de CPV en la médula ósea. La muerte puede resultar de la deshidratación y por el shock debido a los efectos tóxicos producidos por el camino de bacterias secundarias a través del torrente sanguíneo (Aldaz *et al.*, 2013).

2.8. CUADRO CLÍNICO

Los síntomas asociados con la CPV, incluye letargia, depresión, pérdida del apetito, fiebre o temperatura normal, anorexia, vómitos y diarreas que en muchos casos son hemorrágicas, provocando una severa deshidratación, así mismo, también puede causar miocarditis aguda, presentándose este último signo clínico en neonatos (Kumari *et al.*, 2014; Sosa, 2009).

Las primeras manifestaciones de la Parvovirus gastroentérica, se presenta a manera de diarreas amarillentas, las cuales, su consistencia puede ser variable, de pastosa a fluida, siempre caracterizado por una desagradable olor (Dubina, 2013). Todos los signos clínicos pueden verse exacerbados por infecciones secundarias provocados por *Giardia*, *Ancylostoma*, Coronavirus, etc (Sosa, 2009).

La enfermedad puede tener un curso hiperagudo, donde el paciente puede morir

en un lapso de hasta 3 días después de la manifestación clínica. De la misma manera, puede presentar una forma asintomática en caninos de edad avanzada y en cachorros (Sosa, 2009).

2.9. DIAGNÓSTICO

En clínicas veterinarias, se basan principalmente en los signos presentes del animal para el diagnóstico de la enfermedad a veces también hacen uso de un hemograma por la leucopenia causada, sin embargo, al no poseer ningún signo patognomónico y que la leucopenia no es causada en la totalidad de casos (Meunier *et al.*, 1985), es recomendable el uso de técnicas de confirmación. Algunas técnicas de confirmación usadas son la inmunocromatografía, inmunohistoquímica, microscopía electrónica, aunque lo más conveniente es el uso del Kit de ELISA fecal para la detección del Ag viral, debido a que es el más económico y fácil de realizar, sin embargo proporciona muchos falsos negativos (Sosa, 2009). Debido a esto, las técnicas moleculares como el uso de PCR para la determinación del ADN viral están siendo cada vez más populares, ya que al ser una técnica más sensible provee menos falsos negativos (Desario *et al.*, 2005).

La prueba de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación (HA-IHA), es usada para detección de CPV-2 en el suero de los animales. En el suero, esta técnica se basa en la identificación de Ac contra CPV-2, sin embargo si el animal ha estado con contacto previo con el virus, por vacunación, o si tuvieron la infección hace mucho

tiempo, esta prueba resultará positiva, por lo que no es una prueba confirmatoria (Flores, 1987). En Perú, Gamboa (1908) realizó un estudio donde determinaba la presencia del CPV-2 en sueros de animales clínicamente enfermos usando la técnica de IHA. Como resultado, halló 93.5% de positividad a la prueba. Siendo este un estudio confirmatorio de la presencia del virus en nuestro país (Gamboa, 1980). Sin embargo, como ya se mencionó, la presencia de Ac en el suero de los animales pudieron no deberse a la acción del virus en el cuerpo del animal, sino por un contacto previo con el virus o por vacunación.

2.9.1. PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA) PARA EL DIAGNÓSTICO DE CPV-2

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite generar múltiples copias de un determinado fragmento de ADN y distinguirlo del resto del ADN extraído previamente. Es una técnica importante para muchas aplicaciones en biología molecular, existiendo de esta manera muchas variantes de la misma. Es una técnica altamente sensible, debido a que requiere de poca cantidad de ADN para amplificar (Lorenz, 2012; Sosa, 2009).

La gran inversión de costos y tiempo en la extracción de ADN, siempre ha sido una desventaja en la biología molecular, es por ello que se busca técnicas más eficientes, donde se disminuya los costos y el tiempo generando los mismos resultados.

El método por ebullición o *fast boiling* comenzó a usarse como técnica para la extracción de ADN de CPV-2 desde 1995 dando buenos resultados que fueron corroborados por PCR convencional. Asimismo, se ha comprobado que mientras se trabaje con una adecuada cantidad de material fecal, puede usarse también para extracción de ADN bacteriano comparándose con kits comerciales y mostrando buenos resultados, de esta manera se disminuyen costos y tiempo empleado en el procedimiento (Schunk *et al.*, 1995; Peng *et al.*, 2013).

Actualmente se han desarrollado protocolos para la determinación y cuantificación del virus por medio del uso de la PCR convencional y/o PCR en tiempo real respectivamente, de esta manera también se ha podido determinar las variantes del virus que abundan en cada zona (Sosa, 2009).

El uso de PCR por medio de muestras fecales de animales enfermos, se ha usado desde los años 90, ya que además de ser altamente sensible y específica, es una técnica rápida y simple, así mismo, la alta cantidad de virus que se eliminan por las heces hace que se pueda trabajar con pequeñas cantidades de las mismas (10^9 partículas virales por gramo de heces) (Schunk *et al.*, 1995).

En Sudamérica, países como Uruguay, Brasil y Argentina, han usado la técnica de PCR convencional y variantes para la determinación del virus en las heces de animales con signos clínicos compatibles. Así, Sosa (2009) determinó la presencia del virus en 34 de 47 muestras analizadas provenientes de animales con sintomatología

clínica de diarreas hemorrágicas, por medio de la técnica de PCR convencional en Uruguay. En Brasil, Fontana y colaboradores (2013) determinaron la presencia de CPV-2 por PCR convencional en el 54% (27/50) de muestras procedentes de animales con previo histórico de sintomatología clínica compatible a Parvovirus canina, y posteriormente detectaron la presencia de la variante 2c en 13 de sus muestras. Gallo y colaboradores (2015) encontraron que la cepa 2c sigue siendo prevalente en los animales de Argentina, hallándose un total de 41/93 muestras positivas a la técnica de PCR convencional, de las cuales el 90.2% fueron de la variante en mención (Sosa, 2009; Fontana *et al.*, 2013; Gallo *et al.*, 2015)

2.10. CONTROL Y PREVENCIÓN

Factores del animal como el estado nutricional, sanitario y la respuesta inmune rigen un papel muy importante para la prevención de la enfermedad. La presencia de los anticuerpos maternos transmitidos por la placenta y el calostro brindan protección a las crías las primeras semanas de vida, sin embargo se ha determinado que animales que se encuentran en continuo contacto con el agente viral tienen mayores probabilidades de enfermar, a pesar de los Ac maternos. Así mismo se halló una “ventana inmunológica”, donde dichos anticuerpos comienzan a descender, dando lugar a una posible infección, de esta manera los programas de vacunación se recomiendan a partir del día 30 para acortar el periodo de esta “ventana” (Hurtado, 2012; Puentes, 2012). Aun así, la vacunación sigue siendo la primera alternativa de prevención de la enfermedad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DEL ESTUDIO

Todas las muestras tomadas fueron analizadas en la Sección de Biología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

3.2.1. Animales y recolección de muestras

Fueron colectados hisopados rectales de un total de 78 perros jóvenes (menores al año de edad), sin histórico de vacunaciones previas, y procedentes de consultorios veterinarios, de donde fueron divididos en dos grupos, el primero (n=39) con signos clínicos compatibles a la enfermedad: diarreas hemorrágicas, vómitos y temperatura elevada; mientras que el segundo grupo (n=39) fue conformado por animales clínicamente sanos.

Las muestras fueron procedentes de la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (CAM-FMV-UNMSM) y de clínicas veterinarias privadas ubicadas en Villa el Salvador, Surco, Chorrillos y Carabayllo como lugares específicos del muestreo, las

cuales fueron colectadas durante el periodo marzo 2015 hasta enero 2017.

Para los hisopados rectales se usaron hisopos estériles, los cuales luego fueron colocados en crioviales y sellados con parafina para su posterior refrigeración (-80°C), para mejor conservación hasta el momento en que se realizaron la prueba.

3.2.2. Diseño experimental:

Para este estudio, se estimará un tamaño muestral usando para ello la fórmula de Tamaño muestral para una proporción, considerando una proporción de 72% de presentación de la infección en caninos clínicamente enfermos (Sosa, 2009) y un error de 10%.

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.72 \times 0.28}{0.1^2} = 78$$

Estimándose finalmente el uso de 78 individuos para este estudio, los cuales fueron divididos en 2 grupos ya anteriormente mencionados.

3.2.3. Extracción de ADN viral

La extracción de ácidos nucleicos virales se realizó usando una modificación del método de *fast boiling* descrito por Schunk *et al.*(1995), la cual consistió en el homogeneizado del contenido fecal adherido en los hisopos en 500 µL de PBS 1X (Suero Buffer fosfato) estéril, posteriormente, fueron colocados en baño María a 100°C durante 10 minutos con el fin de degradar las cápsides virales y así liberar el ADN.

Pasado los 10 minutos, las muestras fueron inmediatamente colocadas en hielo por 5 minutos para inhibir posibles reacciones enzimáticas presentes en la muestra. Luego, se procedió a centrifugar la muestras a 3000 RPM durante 15 minutos con el fin de separar los remanentes celulares y contaminantes. A continuación se extrajo el sobrenadante con el ADN viral y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis por PCR.

3.2.4. Identificación por PCR

Para ello, se usaron los cebadores F1 y R3 descritos por Sosa (2009) (Cuadro 1), que generaron un fragmento de 1316 pb del gen de la proteína VP2 de CPV-2, usándose como control positivo de la reacción una vacuna comercial Vanguard® Plus CPV (Pfizer), que usa la cepa NL-35-D (CPV-2a), el cual fue sometido al mismo protocolo de extracción de ADN (Sosa, 2009; Pérez *et al.*, 2012).

La mezcla de reacción consistió en las siguientes condiciones: Buffer PCR 1X, 0,4mM de dNTPs, 1mM de Primer F1, 1mM de Primer R3, 2mM de MgCl₂, y 1 U de *Taq* DNA polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador AB 2700 (Applied Biosystems), donde hubo una desnaturalización inicial a 95°C a 5 min., seguido de 30 ciclos de desnaturalización (95° a 1 min), hibridación (42° a 1.45 min) y extensión (72° a 1.45 min), con una extensión final a 72°C en 7 min. Posteriormente los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1% y usando Bromuro de Etidio como colorante revelador.

Cuadro 1. Cebadores utilizados en la amplificación del fragmento de 1316 pb del gen de VP2 de CPV-2, secuencia en sentido 5'-3' y la posición en el genoma en la que hibrida cada uno de ellos.

Cebador	Secuencia	Posición
Forward (F1)	AGATAGTAAATACTATGCCATTT	3316-3340
Reverse (R3)	CCTATATCAAATACAAGTACA	4609-4632

3.2.5. Interpretación de los resultados

Los datos de positividad y negatividad son presentados en tablas de contingencia 2 x

2. Serán calculados los valores predictivo positivo y negativo del diagnóstico clínico comparándolo con la prueba de PCR.

IV. IV. RESULTADOS

Mediante la técnica de PCR se obtuvo un amplicón de 1316 pares de bases del gen de la proteína VP2 de CPV-2 en un 62% del total de las muestras (24/39), las cuales provenían de animales con diagnóstico clínico de Parvovirus Canina. En los animales clínicamente sanos, no se halló ninguna muestra positiva a CPV-2

Cuadro 2. Resultado de la amplificación del gen de la proteína VP2 de CPV-2 y concordancia entre el diagnóstico molecular y diagnóstico clínico.

Diagnóstico molecular (PCR convencional)	Diagnóstico clínico		
		Positivo	Negativo
	Positivo	24 (62%)	0 (0%)
	Negativo	15 (38%)	39 (100%)
	Total	39	39

En comparación con la técnica de PCR para el diagnóstico de la infección por CPV-2 el cálculo de los valores predictivos para el diagnóstico clínico, considerando los datos del cuadro 2, quedaría de la siguiente manera:

Valor predictivo positivo: 61% (positivo a la prueba y enfermo)

Valor predictivo negativo: 100% (negativo a la prueba y sano)

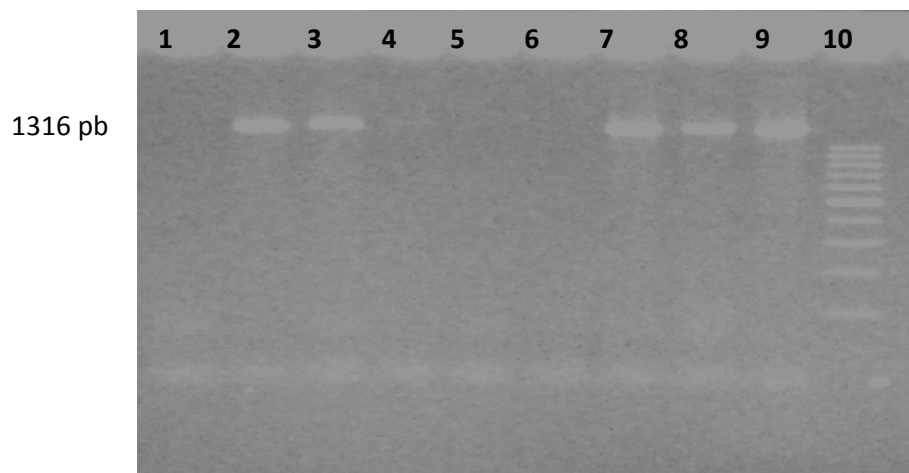


Figura 1. Resultado de la amplificación del gen de la proteína VP2 de CPV-2 de los casos con sintomatología compatible con Parvovirus Canina. 10: Marcador de 100pb; Muestras 2, 3, 7 y 8: casos positivos a CPV-2. Muestras 1, 4, 5 y 6: casos negativos. Muestra 9: control positivo.

IV. DISCUSIÓN

La Parvovirus canina es una enfermedad causada por el virus del Parvovirus Canino, el cual se caracteriza por presentar principalmente un cuadro gastroentérico en cachorros, ocasionando incluso la muerte. La usual determinación de la enfermedad en clínicas veterinarias de la ciudad de Lima es basada principalmente mediante el diagnóstico clínico, debido a costos, a un mal protocolo, a la “rapidez de la atención”, etc. Generando de esta manera, falsos positivos y negativos debido a que la enfermedad no presenta signo patognomónico que lo identifique, y de la misma manera ocasionando un posible tratamiento erróneo para el paciente. Por ello el objetivo del estudio fue determinar la presencia del virus en pacientes con / sin diagnóstico clínico de parvovirus, para determinar cuántos de estos verdaderamente estuvieron infectados con CPV-2.

Actualmente, en las clínicas veterinarias es usual el diagnóstico de la enfermedad en base a los signos clínicos y condiciones de animal, sin embargo, esto tampoco es definitivo para la determinación de la enfermedad. Son pocos los médicos que piden análisis complementarios como *kits* comerciales para tener un diagnóstico más certero, sin embargo también es conocido que estos pueden proveer falsos negativos, ya que al ser una técnica que depende de la unión antígeno-anticuerpo depende también del momento en el que se toma la muestra (Puentes, 2012).

Se colectaron muestras de hisopados rectales de 78 animales, divididos clínicamente en dos grupos diferentes. El primer grupo consta de 39 animales clínicamente compatibles a Parvovirus canina, en el que se halló 62% (24/39) de positividad en la técnica de PCR convencional, mientras que en el segundo grupo conformado por la misma cantidad de animales pero con diagnóstico clínico saludable no se halló ninguna muestra positiva. Estos resultados difieren con los descritos por Gamboa en 1980, donde se encontró 93.50% (29/31) de positividad en animales clínicamente enfermos, pudiendo deberse al aumento de frecuencia de enfermedades con signos clínicos similares, tales como parasitarias, bacterianas y otras virales, ya que como se mencionó anteriormente, esta enfermedad no presenta signo patognomónico característico que lo diferencie de otras enfermedades, provocando principalmente falsos positivos en el diagnóstico clínico, y por ende en la recolección de muestras para este estudio. Vale resaltar que estas proporciones pueden variar ya que el diagnóstico clínico de la enfermedad es subjetivo y depende del “ojo clínico” del médico veterinario encargado de examinar el caso.

El porcentaje de positivos hallado en el primer grupo (62%) por medio de la prueba de PCR convencional nos señalan que la mayoría de casos de gastroenteritis hemorrágica en los cachorros muestreados es debido al CPV-2.

Estudios similares de diagnóstico por medio de técnicas moleculares como PCR convencional hechos en Uruguay por Sosa da Silva (2009), podría mostrar la variabilidad del virus en cuanto a la zona geográfica, pudiendo deberse de esta manera

la diferencia de porcentaje de positivos, encontrándose en dicho país 72% de positividad con la técnica mencionada en animales clínicamente compatibles, sin embargo cabe resaltar que la baja discordancia puede deberse a la similitud de áreas entre ambos países.

En cuanto al segundo grupo, Gamboa (1980), por medio de IHA encontró 65% (13/20) de positividad en animales clínicamente sanos, esto podría deberse al mejor estado sanitario de las mascotas actualmente, ya que se presumiría una mayor dedicación y cuidado por parte de los propietarios hacia sus animales en comparación a 1980, época en el que se realizó el estudio de Gamboa. Este mayor cuidado implicaría el estado sanitario de la mascota: un programa de vacunación, desparasitaciones y la mejor higiene de su ambiente, teniendo en cuenta que una reacción positiva podría indicar el contacto del animal con el virus, posiblemente por una mala limpieza del ambiente.

Los animales de ambos grupos se escogieron bajo los mismos criterios de inclusión: sin vacunaciones previas y menores a un año. Estos criterios fueron determinados debido a que son factores de riesgo de la enfermedad (Dubina, 2013; Ling *et al*, 2012). Dentro del grupo clínicamente enfermo se tomó en consideración los signos clínicos de diarrea sanguinolenta, vómitos, depresión, anorexia, caquexia y deshidratación; además de los criterios anteriormente mencionados. Estos signos clínicos fueron considerados debido a su presencia común en la enfermedad y ya que es usual la determinación de la misma por medio de esta sintomatología en las clínicas veterinarias de Lima Metropolitana, sin ser ninguno de ellos patognomónico (Sosa,

2009).

Los valores predictivo positivo y negativo fueron 61% y 100 % respectivamente. Esto nos sugiere que de cada 100 perros diagnosticados clínicamente a Parvovirus canina, solo 61 serán positivos a PCR convencional; asimismo nos indica que el total de cachorros clínicamente sanos serán negativos a la prueba. Esto nos alerta la existencia de 39 animales negativos a la prueba que serían tratados bajo las mismas condiciones para la enfermedad, pudiendo repercutir en el pronóstico y tratamiento de los animales enfermos. Por lo cual es recomendable el uso de una técnica de complementaria al diagnóstico dado por el médico tratante.

Finalmente, para la parte clínica, es de importancia tomar en cuenta los datos mostrados ya que la existencia de la nueva variante presente en el país abre las posibilidades de la falta de eficacia de las vacunas comerciales frente a esta variante (Oshima *et al.*, 2008). Para lo cual sería recomendable la continuidad de los estudios en relación al mismo, pero tomando como referencia a animales previamente vacunados. En este estudio solo se tomó en consideración signos clínicos como diarreas sanguinolentas y el estado sanitario sin vacunaciones previas, se recomienda identificar cuáles son las variantes circulantes en nuestra zona como fin de vigilancia epidemiológica.

VI. CONCLUSIÓN

Es posible la amplificación de un fragmento de 1316 bp del gen de la proteína VP2 de la CPV-2 a partir de hisopados rectales, en el 61% (24/39) de las cepas positivas a parvovirus por diagnóstico clínico mediante el protocolo de extracción y de PCR presentado en este trabajo.

VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. **Aldaz J, García J, Caballeros L, Sosa K, Iraola G, Marandino A, Hernández M, Panzera Y, Pérez R. 2013.** High local genetic diversity of canine from Ecuador. *Vet Microbiol* 166: 214-219.
2. **Chiang S, Wu H, Chiou M, Chang M, Lin C. 2016.** Identification of a novel canine parvovirus type 2c in Taiwan.
3. **Cotmore S, Agbanje M, Chiorini J, Mukha D, Pintel D, Qiu J, Soderlund M, Tattersall P, Tijssen P, Gatherer D, Davison A. 2014.** The family *Parvoviridae*. *Arch Virol* 159: 1239-1247.
4. **Decaro N, Buonavoglia C. 2012.** Canine parvovirus- A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol* 155: 1-12
5. **Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C. 2005.** Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus?. *J Virol Methods* 126: 179-185
6. **Díaz C, Correa J, Vera V. 2008.** Aspectos moleculares del virus de la Parvovirosis Canina y sus implicancias en la enfermedad. *Rev Medicina Veterinaria* 15: 57-65.
7. **Dubina L. 2013.** Detecção e caracterização de parvovirus canino e coronavirus canino. Tesis de Doctorado. Porto Alegre: Univ. Federal de Rio Grande do Sul. 74 p.
8. **Ernst S, Martin R, Thibaut J. 1992.** Distribución temporal de la parvovirosis clínica en una población canina hospitalaria de Valdivia, Chile

- (1981-1990). Avances en Ciencias Veterinarias 2: 99-104
9. **Flores R. 1987.** Parvovirus canina y aspectos de inmunización. Revista en Ciencias Veterinarias 4: 131-159
 10. **Fontana D, Rocha P, Cruz R, López L, Melo A, Silveira M, Aguiar D, Pescador. 2013.** A phylogenetic study of canine parvovirus type 2c in midwestern Brazil. Pes Vet Bras. 33: 214-218
 11. **Gallo C, Romanutti C, Wilda M, D'Antuono A, Keller L, Bucci, M, Giacomodonato M, Mattion N, La Torre J. 2015.** Evolución del Parvovirus Canino: la cepa 2c continúa siendo prevalente en la población canina de Argentina. En: XI Congreso Argentino de Virología, II Congreso Latinoamericano de Virología. Argentina: Sociedad Argentina de Virología.
 12. **Gamboa N. 1980.** Comprobación serológica de la gastroenteritis hemorrágica aguda canina por parvovirus en el área de Lima. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 41 p.
 13. **García I. 2007.** Manejo clínico de la Parvovirus canina en urgencias. Rev Complutense CiencVet 2: 1998-2688.
 14. **Hurtado D. 2012.** Nueva perspectiva de la parvovirus canina en el sur del valle de Aburra. Tesis de Médico Veterinario. Antioquía: Corporación Universitaria Lasallista. 51 p.
 15. **Kumari M, Prasad A, Ganguly S. 2014.** Elicitation of immune response in pups against parvovirus infection. Int J Current Trends Pharm Research 2: 428-431.
 16. **Landis J, Koch G. 1977.** The measurement of Observer agreement for

Categorical Data. *Biometrics* 33: 159-176.

17. **Ling M, Norris J, Kelman M, Ward M. 2012.** Risk factors for death from canine parvoviral-related disease in Australia. *Vet Microbiol* 158: 280-290.
18. **Lorenz T. 2012.** Polymerase Chain Reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* 63: e3998
19. **Maya L, Calleros L, Francia L, Hernández M, Iraola G, Panzera Y, Sosa K, Pérez R. 2012.** Phylodynamic analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Arch Virol* 158: 1133-1141.
20. **Meunier P, Cooper B, Appel M, Lanieu M, Slauson D. 1985.** Pathogenesis of canine Parvovirus Enteritis: Sequential Virus Distribution and Passive Immunización Studies. *Vet Pathol* 22: 617-624.
21. **Nandi S, Chidri S, Kumar M. 2009.** Molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus isolate in India. *Vet Med* 54: 483-490.
22. **Oshima T, Hisaka M, Kawakami K, Kishi M, Tohya Y, Mochizuki M. 2008.** Chronological Analysis of Canine parvovirus Type 2 isolates in Japan. *J Vet Med Sci* 70: 769-775.
23. **Parker J, Parrish C. 1997.** Canine Parvovirus Host Range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J Virol* 71: 9214-9222.
24. **Peng X, Yu K, Deng G, Jiang Y, Wang Y, Zhang G, Zhou H. 2013.** Comparison of direct boiling method with commercial kits for

- extracting fecal microbiome DNA by Illumina sequencing of 16S rRNS tags. J Microbiol Methods 95: 3.
25. **Pérez R, Bianchi P, Calleros L, Francia L, Hernández M, Maya L, Panzera Y, Sosa K, Zoller S. 2012.**Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. Vet Microbiol 155: 214-219.
 26. **Pérez R, Francia L, Romero V, Maya L, Lopez I, Hernández M. 2007.** First detection of canine parvovirus type 2c in South America. Vet Microbiol 124: 147-152.
 27. **Pérez R, Calleros L, Marandino A, Sarute N, Iraola G, Grecco S, Blanc H, Vignuzzi M, Isakov O, Shomron N, Carrau L, Hernández M, Francia L, Sosa K, Tomás G, Panzera Y. 2014.** Phylogenetic and Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain. PlosOne 9: e111779.
 28. **Puentes R, Eliopulos N, Pérez R, Franco G, Sosa K, Bianchi P, Furtado A, Hubner S, Esteves P. 2012.** Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c (CPV-2c) from symptomatic puppies. Braz J Microbiol 43: 1005-1009.
 29. **Puentes R. 2012.** Parvovirosis Canina: situación actual y protección de las vacunas contra las nuevas variantes virales circulantes en la región. Veterinaria (Montevideo) 48: 5-10.
 30. **Schunck B, Kraft W, Truyen U. 1995.** A simple touch-down polymerase

chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. J Virol Methods 55:427-433.

31. **Sosa K. 2009.** Estudio de la diversidad del Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) mediante el análisis de repetidos en el genoma viral. Tesis de Ciencias Biológicas. Montevideo: Univ. de la República. 51p.
32. **Zhao Y, Lin Z, Lu C, Zeng X, Hou J. 2013.** Genotyping and Pathobiologic characterization of canine parvovirus circulating in Nanjing, China. Virol J 10: 272.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Cuadro general de datos de perros muestreados clínicamente enfermos.

CÓDIGO	FECHA	NOMBRE	EDAD	DISTRITO	SIGNOS
2	23/04/2015	Candy	1 mes	Santa Anita	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
4	08/05/2015	Candy	2 mes	SJM	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
6	10/06/2015	Matías	4 mes	Cercado	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
7	20/08/2015	Dante	2 mes	Cercado	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
8	10/09/2015	Chester	7 mes	La Victoria	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
10	17/09/2015	Aisha	1 mes	La Molina	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
12	30/09/2015	Paul	7 mes	Lurín	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
13	18/11/2015	Diana	3 mes	SJL	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
14	18/12/2015	Chelsea	3 mes	La Molina	Dolor, diarreas con sangre, vómitos, alta T°
16	25/01/2016	Tita	3 mes	San Luis	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
24	01/04/2016	S/n 1	2 mes	Chosica	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
25	01/04/2016	S/n 2	2 mes	Chosica	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
26	01/04/2016	S/n 3	2 mes	Chosica	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
27	18/04/2016	Bella	7 mes	Cercado	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°, murió
28	21/04/2016	Rocky	9 mes	Cercado	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
29	21/04/2016	Ollanta	4 mes	Pachacamac	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
30	16/05/2016	Tayron	3 mes	La Victoria	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
31	16/05/2016	Vaqui	9 mes	Ate Vitarte	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
32	16/05/2016	Marroncita	2 mes	San Martín	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
34	19/05/2016	Scooby	9 mes	Ate Vitarte	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°

VES-1	17/08/2015	Dexter	1 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°, inapetente
VES-2	17/08/2015	Densel	4 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°, inapetente
VES-3	17/08/2015	Jean paul	2 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-4	22-Ago	Lucas	3 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-6	16/09/2015	Candy	4 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-7	22/09 2015	Pucca	3 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-8	23/10/2015	Bambino	3 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-9	19/11/2015	Lucas	4 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-10	23/11/2015	Sriko	2 mes	Chorrillos	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-11	23/11/2015	Jumbo	2 mes	Chorrillos	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-12	24/12/2015	Chado	4 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-14	26/12/2015	Dasha	4 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-15	31/12/2015	Mora	3 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-16	26/01/2016	Ketty	2 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-17	26/01/2016	Kira	3 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-18	04/02/2016	Preciosa	3 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-19	08/02/2016	Fiorella	6 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-20	13/05/2016	Leon	2 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°
VES-21	13/05/2016	Pequeña	8 mes	VES	Diarreas con sangre, vómitos, alta T°, (+) a Kit

Anexo 2. Cuadro general de datos de pacientes clínicamente sanos

CÓDIGO	FECHA	NOMBRE	EDAD	DISTRITO
A.1	05/08/2016	Toby	7 mes	Villa María
A.2	22/09/2016	Angie	2 mes	Villa María
A.3	22/09/2016	Ana Lucía	3 mes	Carabayllo
A.4	10/10/2016	Gris	3 mes	Chorrillos
A.5	11/10/2016	Marvin	2 mes	San Luis
A.6	27/10/2016	Paquito	2 mes	Cercado
A.7	05/11/2016	Princesa	2 mes	Cercado
A.8	27/11/2016	Bobby	1 mes	Magdalena
A.9	27/11/2016	León	1 mes	Magdalena
A.10	27/11/2016	S/n 3	1 mes	Magdalena
A.11	27/11/2016	S/n 4	1 mes	Magdalena
B.1	29/10/2016	Lissie	1 mes	Carabayllo
B.2	12/11/2016	Arthur	2 mes	Carabayllo
B.3	12/11/2016	Candy	5 mes	Carabayllo
B.4	26/11/2016	Oso	2 mes	Carabayllo
S.1	19/11/2016	Marroquín	1 mes	VES
S.2	19/11/2016	Negra	1 mes	VES
S.34	04/12/2016	Laica	4 mes	Surco
S.3	05/12/2016	Kina	1mes	VES
S.4	05/12/2016	Peluchín	1 mes	VES
S.5	11/12/2016	Osito	1 mes	VES
S.6	11/12/2016	Tricolor	1 mes	VES

S.7	11/12/2016	Negro	1 mes	VES
S.8	11/12/2016	Fuffy	1 mes	VES
S.9	11/12/2016	Laica	1 mes	VES
S.10	17/12/2016	s/n 5	1 mes	SJL
S.11	17/12/2016	S/n 6	1 mes	SJL
S.12	17/12/2016	S/n 7	1 mes	SJL
S.13	17/12/2016	S/n 8	1 mes	SJL
S.14	17/12/2016	S/n 9	1 mes	SJL
S.15	17/12/2016	S/n 10	1 mes	SJL
S.16	17/12/2016	S/n 11	1 mes	SJL
S.17	21/21/2016	Princesa	3 mes	Chorrillos
S.18	25/12/2016	S/n 12	1 mes	Chorrillos
S.19	27/12/2016	Ashley	2 mes	SJM
S.20	28/12/2016	S/n 13	1 mes	Surco
S.21	28/12/2016	S/n 14	1 mes	Surco
S.22	28/12/2016	S/n 15	1 mes	Surco
S.23	28/12/2016	S/n 16	1 mes	Surco

VES: Villa el Salvador

SJM: San Juan de Miraflores

SJL: San Juan de Lurigancho

S/n: Sin nombre